ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 36, 6, 2002

УДК 576.893.195 : 577

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA GRYLLI ПРИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ РАЗВИТИИ

© В. В. Долгих, П. Б. Семенов, М. В. Григорьев

Длительная адаптация микроспоридий к внутриклеточному развитию позволяет предположить использование паразитами АТФ клетки хозяина для обеспечения процессов мерогонии и спорогонии. С целью подтверждения этого предположения в работе было проведено сравнение активностей 10 ферментов углеводного и энергетического обмена в стадиях внутриклеточного развития и зрелых спорах микроспоридии *Nosema grylli*, паразитирующей в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus*. В результате исследования обнаружена более низкая активность ферментов гликолиза, а также глюкозо-6-Ф дегидрогеназы и фосфоглюкомутазы в активно развивающихся меронтах и ранних споронтах по сравнению с покоящимися спорами. Полученные данные свидетельствуют о том, что гликолиз не является основным механизмом синтеза АТФ при внутриклеточном развитии паразитов. Сравнение влияния инвазии на содержание запасных углеводов и липидов в жировом теле сверчков также не выявило избирательного расходования углеводов. Содержание триглицеридов и гликогена снижается при заражении приблизительно в одинаковой степени (в 2—3 раза). Микроспоридии не могут самостоятельно использовать липиды хозяина в качестве энергетического субстрата, так как у них отсутствуют митохондрии, цикл Кребса и компоненты электрон-транспортной цепи. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу паразитирования микроспоридии *N. grylli* на АТФ-синтезирующей системе жирового тела сверчка. Предполагаемое потребление паразитом экзогенной АТФ сопровождается усилением энергетического обмена клетки хозяина, поскольку в зараженном жировом теле по сравнению с контролем приблизительно в 4 раза увеличивается содержание АТФ и соотношение концентраций АТФ/АДФ.

Микроспоридии являются одноклеточными паразитами, развитие которых полностью происходит в цитоплазме клетки хозяина. Стадией переживания во внешней среде является спора, обладающая толстой, сложно устроенной оболочкой и уникальным аппаратом экструзии, обеспечивающим механическое проникновение спороплазмы во вновь инвазируемую клетку. Длительное время считали, что микроспоридии являются древнейшими паразитами среди эукариот, перешедшими к внутриклеточному существованию еще до появления в атмосфере достаточных количеств кислорода. Вследствие этого они лишены митохондрий (Исси, 1978; Vossbrinck e. a., 1987; Hashimoto, Hasegawa, 1996). Однако в настоящее время получены убедительные данные о филогенетической близости микроспоридий с грибами (Van de Peer e. a., 2000; Weiss, 2001). При этом отсутствие у микроспоридий митохондрий, лизосом, пероксисом, запасных питательных веществ в виде гранул или включений, а также характерный для большинства видов маленький по сравнению с другими эукариотами размер генома (около 3 × 106 п. н.) рассматриваются не как примитивные черты, а как результат длительной адаптации к внутриклеточному паразитизму.

Общей тенденцией в эволюции всех внутриклеточных паразитов является усиление метаболической зависимости от клетки хозяина, сопровождающееся утратой или снижением интенсивности ряда собственных биохимических путей. Характерной особенностью энергетического метаболизма различных внутриклеточных паразитов является использование АТФ клетки хозяина. Транспорт АТФ через мембрану паразита может осуществляться с помощью специфичных переносчиков адениновых нуклеотидов — АТФ/АДФ-транслоказ (ААТ), обнаруженных во внутренней мембране митохондрий, пластидах растений (Kampfenkel e. a., 1995), а также в цитоплазматической мембране таких внутриклеточных прокариотических паразитов, как *Rickettsia prowazekii* и *Chlamydia trachomatis* (Zomorodipour, Andersson, 1999). Транспорт АТФ между паразитом и цитоплазмой клетки хозяина был продемонстрирован и у эукариотических внутриклеточных паразитов (тип Apicomplexa).

Предположение об использовании микроспоридиями АТФ клетки хозяина было выдвинуто на основании данных о том, что добавление АТФ в среду для культивирования спороплазм микроспоридии *Nosema michaelis* поддерживает сохранение *in vitro* их структуры. В пользу этого свидетельствуют и ультраструктурные данные о плотном контакте митохондрий хозяина с цитоплазматической мембраной внутриклеточных стадий микроспоридий (Durfort, Vallinitjana, 1982). Наличие специфичных АТФ/АДФ-переносчиков у этих паразитов было недавно подтверждено в результате полной расшифровки генома микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi*, позволившей провести его компьютерный анализ и обнаружить последовательности 4 генов, кодирующих ААТ (Katinka e. a., 2001). Предсказанные аминокислотные последовательности белков показали наибольшую степень сходства с переносчиками внутриклеточной бактерии *R. prowazekii*.

Возможность импорта микроспоридиями АТФ хозяина ставит вопрос о возможности снижения роли гликолиза в обеспечении энергией стадий внутриклеточного развития этих паразитов по сравнению со спорами. С этой целью мы провели измерение удельных активностей ряда ферментов углеводного обмена, в том числе и гликолиза, в очищенных меронтах и ранних споронтах микроспоридии *N. grylli* и сравнили эти значения с данными, ранее полученными для спор. Кроме того, мы попытались оценить влияние заражения на снижение содержания в клетке хозяина запасных углеводов и липидов. В случае преимущественного синтеза собственной АТФ амитохондриальные паразиты будут избирательно использовать углеводы хозяина. Однако если АТФ для паразитов синтезируется митохондриями зараженной клетки, то в качестве энергетического субстрата в равной мере могут служить и липиды, и углеводы. Для оценки влияния микроспоридий на интенсивность энергетического обмена клетки хозяина было проведено сравнение содержания в зараженной и контрольной (незараженной) тканях следующих субстратов: свободная глюкоза, глюкозо-6-фосфат, пируват, АТФ, АДФ и соотношение концентраций АТФ и АДФ. Полученные в результате настоящего исследования данные свидетельствуют в пользу использования микроспоридией *N. grylli* АТФ клетки хозяина для обеспечения энергией процессов мерогонии и спорогонии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на лабораторной «популяции» двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus*, искусственно зараженной микроспоридией *Nosema grylli* (Соколова и др., 1994), паразитирующей в жировом теле насекомых. Жировое тело сверчков препарировали, промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ, 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, pH 6.8) и использовали в дальнейших экспериментах.

Измерение активностей ферментов в спорах и стадиях. Стадии внутриклеточного развития выделяли центрифугированием в градиенте плотности Перколла и инкубировали в ФСБ, содержащем 0.1 % Тритона X-100, на холоду в течение 10 мин. Разрушенные детергентом стадии центрифугировали при 17 000 g 10 мин, и супернатант использовали для определения активности ферментов. Очистку и разрушение спор в ФСБ проводили по ранее разработанной методике (Dolgikh e. a., 1997). Активность всех ферментов измеряли при длине волны 340 нм и температуре 37°. Состав реакционной смеси для глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Гл-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49), фосфоглюкомутазы (ФГМ, КФ 5.4.2.2), гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1), фосфоглюкоизомеразы (ФГИ, КФ 5.3.1.9), 3-фосфоглицераткиназы (ФГК, КФ 2.7.2.3) (1-й метод), пируваткиназы (ПК, КФ 2.7.1.40), глицерол-3-фосфат дегидрогеназы (Г-3-ФДГ, КФ 1.1.1.8) был приготовлен согласно ранее использованной методике (Dolgikh e. a., 1997). Реакционная смесь для измерения активностей фосфофруктокиназы (ФФК, КФ 2.7.1.11), ФГК (2-й метод) и АТФ-азы содержала: 100 mM Трис-HCl (pH 7.8), 100 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM АТФ, 1 mM фосфо(енол)пирувата, 0.2 mM НАДН, 2 Е/мл ПК, 0.5 Е/мл лактатдегидрогеназы и пробу. Дополнительно при измерении ФФК и ФГК смесь содержала соответственно 1 mM фруктозо-6-фосфата или 2 mM 3-фосфоглицерата (контроль не содержал фруктозо-6-фосфат в случае ФФК, 3-фосфоглицерат в случае ФГК или пробу). При измерении АТФ-азы в контрольную смесь не добавляли АТФ или пробу.

Измерение содержания запасных веществ в жировом теле сверчков. Жировые тела контрольных и зараженных личинок сверчков последнего возраста взвешивали и использовали для экстракции гликогена и общих липидов. Ткань экстрагировали кипячением в 30 %-ном KOH, нерастворенный материал удаляли центрифугированием, а гликоген осаждали добавлением 1.2 объема 96 %-ного этанола, переосаждали, осадок высушивали и гидролизовали в 0.6 н HCl. В нейтрализованном растворе определяли концентрацию глюкозы энзиматическим методом с использованием препаратов ГК и Г-6-ФДГ (Практикум по биохимии, 1989). Липиды экстрагировали по методу Фолча и после выпаривания растворителя определяли конечную массу экстракта. Экстракт разводили хлороформом и хроматографировали на пластинках с силикагелем G по стандартным методикам в системе гексан/этиловый эфир/ледяная уксусная кислота в соотношении 90/20/1. Проявление пластинок проводили с парами иода. В качестве свидетеля использовали липидные экстракты свиного сала и митохондрий быка.

Определение содержания субстратов энергетического обмена в жировом теле сверчков

Поскольку зараженное жировое тело содержит значительное количество стадий и тяжелых спор микроспоридий, концентрацию субстратов определяли в гомогенате жирового тела после осаждения паразитов. С этой целью отпрепарированные жировые тела промывали в ФСБ и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе тефлоновым пестиком в том же растворе. Гомогенат центрифугировали при 300 g 5 мин и к супернатанту добавляли хлорную кислоту до 5 %. Все операции проводили быстро и при 0°. Полученные безбелковые экстракты нейтрализовали KOH и использовали для определения концентрации субстратов. Содержание всех субстратов измеряли энзиматическим методом. В качестве вспомогательных ферментов использовали: Г-6-ФДГ для определения глюкозо-6-фосфата, ГК и Г-6-ФДГ при определении свободной глюкозы и АТФ, лактатдегидрогеназу при определении пирувата, ПК и лактатдегидрогеназу при определении концентрации АДФ. Содержание субстратов рассчитывали в нмолях на мг белка в супернатанте после осаждения паразитов.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованный в работе метод очистки позволяет выделить интактные стадии внутриклеточного развития *N. grylli* (рис. 1, *А*). Последующая инкубация очищенных стадий в присутствии 0.1 % Тритона X-100 приводит к разрушению плазматической мембраны и высвобождению в среду внутриклеточного содержимого (рис. 1, *Б*). Полученный материал был использован для тестирования активностей десяти ферментов углеводного и энергетического метаболизма (табл. 1). Следует отметить, что все изученные ферменты, за исключением АТФ-азной активности, локализованы в цито-

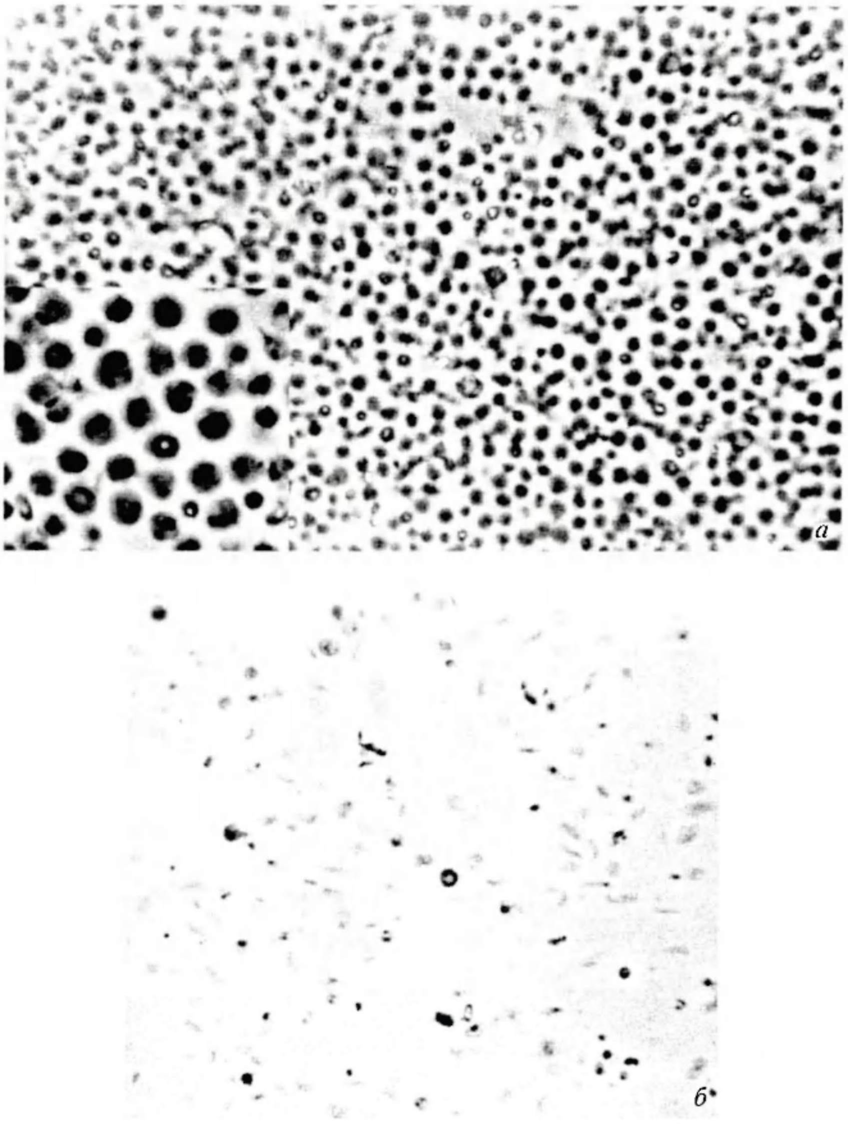

Рис.1. Очистка и разрушение меронтов и ранних споронтов микроспоридии *Nosema grylli*.

А — выделенные методом центрифугирования в градиенте плотности Перколла внутриклеточные стадии в ФСБ (фазовый контраст, ×220, ×600); *Б* — инкубация выделенных стадий в присутствии 0.1 %-ного Тритона Х-100 вызывает разрыв цитоплазматической мембраны и высвобождение содержимого клетки (фазовый контраст, ×220).

Fig. 1. Cleaning and destruction of meronts and earlier sporonts of the microsporidia *Nosema grylli*.

золе. В связи с этим присутствие незначительного количества ядер клеток хозяина во фракции очищенных стадий не влияет на полученные результаты. Аналогичные ферменты зараженной клетки в пробы микроспоридий с ядрами попасть не могут. Сравнение полученных данных с активностью ферментов, наблюдаемой в спорах (Dolgikh e. a., 1997), показало, что активность ГК в стадиях, как и в спорах находится за границей чувствительности использованного метода. ФГМ и ФФК не выявляются в стадиях, в то время как в спорах обнаруживается достоверная активность обоих ферментов. В спорах ранее была обнаружена очень высокая активность ФГИ, однако

Таблица 1

Сравнение удельной активности ферментов углеводного
и энергетического обмена в спорах и клетках внутриклеточных
стадий развития микроспоридии *N. grylli*

Table 1. Comparison of activities of carbohydrate
and energetic metabolism enzymes in spores and cells of intracellular
stages of microsporidia *Nosema grylli*

Фермент	Споры	Меронты и ранние споронты
Гл-6-Ф	15 ± 1*	7 ± 1 (8)[а]
ФГМ	7 ± 1*	< 1 (4)
ГК	< 0.2*	< 1 (5)
ФГИ	1549 ± 255*	23 ± 2 (9)
ФФК	10 ± 1*/13 ± 3[б]	< 1 (5)
ФГК (1-й способ)	16 ± 4*	7 ± 1 (5)
ФГК (2-й способ)	16 ± 2 (2)	8 ± 1 (4)
ПК	6 ± 1*	2 ± 0.3 (5)
Г-3-ФДГ	16 ± 2*	17 ± 3 (5)
АТФ-аза	7 ± 1 (3)	17 ± 4 (4)

Примечание. [а] — значения в скобках показывают число независимо проведенных процедур очистки; [б] — активность ФФК в спорах, измеренная по использованной в данной статье методике; * — значения представлены по материалам статьи Dolgikh e. a., 1997.

в стадиях активность этого фермента снижается приблизительно в 50 раз. В 2 раза были также снижены активности Г-6-ФДГ, ФГК и ПК в стадиях по сравнению со спорами. Активность Г-3-ФДГ достоверно не отличалась в спорах и в стадиях, а активность АТФ-азы была в стадиях даже выше, чем в спорах.

Наблюдаемое в меронтах и ранних споронтах снижение активности 6 ферментов по сравнению со спорами не связано с потерями в ходе очистки, поскольку использованный метод выделения позволяет сохранить целостность стадий. Действие протеаз также, вероятно, не является причиной столь низких значений активности ферментов в стадиях, поскольку ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле с сополимеризованным желатином в качестве субстрата не выявил более высокой активности протеаз в выделенных стадиях по сравнению со спорами (неопубликованные данные). Кроме того, активность отдельных ферментов снижается в стадиях в разной степени, в то время как активность Г-3-ФДГ не изменяется по сравнению со спорами, а активность АТФ-азы даже возрастает.

Различные группы анаэробных паразитических простейших обеспечивают потребности в АТФ за счет реакций гликолиза. В связи с этим более низкая активность гликолитических ферментов внутриклеточных стадий микроспоридий по сравнению со спорами оказалась неожиданной. Очевидно, что интенсивно размножающиеся меронты и ранние споронты, для которых характерно начало процессов спорогонии, нуждаются в значительно большем количестве АТФ, чем покоящиеся зрелые споры. Все это указывает на существование других механизмов продукции АТФ для развития паразитов. Микроспоридии лишены митохондрий, компонентов цикла Кребса и электрон-транспортной цепи (Katinka e. a., 2001). Это делает невозможным синтез АТФ в результате окислительного катаболизма различных субстратов и, в первую очередь, жирных кислот самими паразитами. Таким образом, остается предположить, что внутриклеточные стадии микроспоридии *N. grylli* используют АТФ клетки хозяина, транспортируемый с помощью АТФ/АДФ-переносчиков, аналогичных обнаруженным в геноме *E. cuniculi*.

Для подтверждения этого предположения мы провели сравнение влияния микроспоридий на содержание гликогена и липидов в жировом теле сверчков (табл. 2). Исследование показало, что в зараженной клетке наблюдается достоверное снижение

Таблица 2

Сравнение содержания гликогена
(нм глюкозы/мг сырого веса ткани) и общих липидов
(мкг липидного экстракта/мг сырого веса ткани)
в жировом теле контрольных и зараженных сверчков

Table 2. Comparison of glycogen content
(nm of glucose/mg of crude weight of tissue) and lipids
(mkg of lipid extract/mg of crude weight of tissue) in the fat bodies
of control and infected crickets

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95 %-ный уровень достоверности различий
Гликоген	88 ± 17 (17)[a]	30 ± 8 (14)	+
Общие липиды	247 ± 30 (10)	114 ± 10 (5)	+

Примечание. [a] — значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков.

содержания обоих компонентов. Концентрация гликогена снижается приблизительно в 2.9 раза. При этом следует учесть, что значительная часть потребляемой паразитами глюкозы не расходуется на производство АТФ, а запасается в больших количествах в спорах в виде трегалозы (Vandermeer, Gochnauer,1971; Undeen e. a., 1987). Содержание общих липидов в зараженной жировой ткани снижается по сравнению с контролем в 2.2 раза. Тонкослойная хроматография экстрагированных липидов на силикагелевых пластинах позволила установить, что в контрольном жировом теле основную долю липидов составляют триглицериды, которые и являются главным энергетическим резервом клетки. В инвазированном жировом теле снижение содержания липидов происходит именно за счет этой фракции (рис. 2). При этом заражение вызывает увеличение в ткани хозяина доли полярных липидов, что, вероятно, связано с усиленным мембраногенезом в клетках паразитов. Таким образом, содержание резервных триглицеридов снижается в зараженном жировом теле более чем в 2.2 раза. Значительное снижение содержания жира в жировом теле насекомых при микроспоридиозе отмечалось и другими авторами (Canning, 1962; Darwish e. a., 1989), в том числе и у сверчков *G. bimaculatus*, инвазированных *N. grylli* (Селезнев и др., 1996).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии в зараженной клетке избирательного расходования углеводов как единственно возможного субстрата для синтеза АТФ самими паразитами в ходе малоэффективного гликолиза. Приблизительно равное снижение содержания гликогена и триглицеридов в зараженной клетке, скорее, указывает на использование паразитами обменных процессов хозяина, поскольку метаболическая система жирового тела насекомых может использовать в равной мере углеводы, жиры и другие соединения для продукции АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

Сравнение содержания субстратов и промежуточных продуктов энергетического обмена в жировом теле контрольных и зараженных сверчков показало, что паразиты вызывают достоверное увеличение концентрации АТФ в цитоплазме клетки хозяина приблизительно в 4 раза (табл. 3). При этом концентрация АДФ в зараженной ткани достоверно не отличается от контроля. Таким образом, в инвазированной клетке наблюдается и значительное увеличение соотношения концентраций АТФ/АДФ. Следует отметить, что показатель АТФ/АДФ является постоянным для каждой пробы независимо от степени ее разведения. Это позволяет избежать возможных неточностей, связанных с определением концентрации белка. С помощью использованного метода ни в зараженном, ни в контрольном жировых телах пируват выявлен не был, что, вероятно, связано с его интенсивным потреблением митохондриями. В жировом теле сверчков обнаружено относительно высокое содержание свободной глюкозы. Концентрация глюкозы значительно варьировала у отдельных особей, но различий

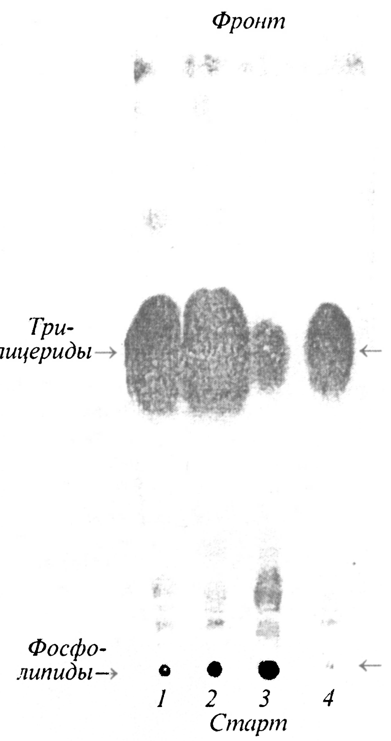

Рис 2. Разделение липидов жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* методом тонкослойной хроматографии.

1, 2 — незараженное жировое тело; *3* — жировое тело сверчка, зараженное микроспоридией *N. grylli*; *4* — стандарт.

Fig. 2. Separation of lipids from the fat bodies of the crickets *Gryllus bimaculatus* by the method of fine-layered chromotography.

между контрольными и зараженными насекомыми по этому показателю мы не обнаружили. Среднее значение концентрации глюкозо-6-фосфата при заражении возрастает приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем, однако достоверность этих отличий ниже уровня достоверности 95 %.

Необходимость предварительного удаления спор и внутриклеточных стадий микроспоридий не позволила нам провести гомогенизацию ткани хозяина непосредственно в растворе хлорной кислоты. Таким образом, представленные данные, по всей видимости, не отражают действительного содержания этих соединений в жировом теле сверчков in vivo. Однако достоверное увеличение концентрации АТФ и соотношения АТФ/АДФ в пробах зараженного жирового тела по сравнению с контролем позволяет сделать вывод об усилении интенсивности процессов, направленных на синтез АТФ в зараженной клетке. Ранее нами было показано значительное увеличение (в 5—10 раз) активности лактатдегидрогеназы (Долгих и др., 1995), Г-3-ФДГ и ПК (Долгих, 1998) в жировом теле сверчков, зараженном микроспоридиями *N. grylli*, что также свидетельствует об усилении энергетического катаболизма в инвазированной клетке. Полученные результаты согласуются с данными о том, что развитие микроспоридий в насекомых вызывает повышение функциональной активности митохондрий (Weidner e. a.,

Таблица 3

Сравнение содержания ряда субстратов энергетического обмена в жировом теле контрольных и зараженных сверчков (нмоль/мг белка в гомогенатах жирового тела после осаждения паразитов)

Table 3. Comparison of energetic metabolism substrate contents in the fat body of control and infected crickets (nmol/mg of proteins in homogenates of fat body after the precipitation of parasites)

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95 %-ный уровень достоверности различий
Глюкоза	152 ± 69 (7)[а]	187 ± 45 (7)	—
Глюкозо-6-Ф	16 ± 6 (10)	35 ± 6 (10)	—
Пируват	Не обнаружен	Не обнаружен	
АТФ	7 ± 1 (10)	30 ± 6 (10)	+
АДФ	21 ± 6 (8)	26 ± 6 (11)	—
АТФ/АДФ	0.3 ± 0.1 (9)[б]	1.2 ± 0.3 (9)	+

Примечание. [а] — значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков; [б] — среднее соотношений концентраций АТФ/ФДФ, вычисленных для каждой отдельно проанализированной особи.

1999), а также усиленное поглощение кислорода на уровне целого организма (Lewis e. a., 1971).

Приведенные в работе данные свидетельствуют об использовании микроспоридией *N. grylli* на стадии внутриклеточного развития АТФ, синтезируемой клеткой хозяина. Однако для окончательного подтверждения этого предположения требуется доказать присутствие АТФ/АДФ-переносчиков в цитоплазматической мембране паразитов.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 01-0-49123а).

Список литературы

Долгих В. В. Влияние микроспоридии Nosema grylli и кокцидии Adelina grylli на активность четырех ферментов энергетического и углеводного обмена в жировом теле сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 464—469.

Долгих В. В., Григорьев М. В., Соколова Ю. Я., Исси И. В. Влияние заражения микроспоридией Nosema grylli и кокцидией Adelina sp. на активность и состав изоферментов лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 6. С. 520—524.

Исси И. В. Эволюция и филогения микроспоридий // Тр. ЗИН АН СССР. 1978. Т. 78. С. 30—43.

Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.

Селезнев К. В., Антонова О. А., Исси И. В. Микроспоридиоз сверчков Gryllus bimaculatus (Gryllidae), вызванный микроспоридией Nosema grylli (Nosematidae) // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 3. С. 250—262.

Соколова Ю. Я., Селезнев К. В., Долгих В. В., Исси И. В. Микроспоридия Nosema grylli n. sp. из сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 6. С. 488—493.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principle of protein-dye binding //Anal. Biochем. 1976. Vol. 72. P. 248—254.

Canning E. U. The pathogenicity of Nosema locustae, Canning // J. Insect. Pathology. 1962. Vol. 4. P. 248—256.

Dolgikh V., Sokolova J., Issi I. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian, Nosema grylli // J. Euk. Microbiol. 1997. Vol. 44. P. 246—249.

Darwish A., Weidner E., Fuxa J. Vairimorpha necatrix in adipose cells of Trichoplusia ni // J. Protozool. 1989. Vol. 36. P. 308—311.

Durfort M., Vallinitjana L. Ultrastructura of merontes and spores of Unikaryon mytilicolae (Microspora, Unikaryonidae), hyperparasite of the Copepoda Mytilicola intestinalis // Rev. Iberica Parasitol. 1982. Vol. 42, N 2. P. 143—160.

Hashimoto T., Hasegawa M. Origin and early evolution of eukaryotes inferred from the amino acid sequences of translation elongation factors 1alpha/Tu and 2/G // Adv. Biophys. 1996. Vol. 32. P. 73—120.

Kampfenkel K., Mohlmann T., Batz O., Van Montagu M., Inze D., Neuhaus H. E. Molecular characterisation of an Arabidopsis thaliana cDNA enccoding a novel putative adenylate translocator of higher plants // FEBS Letters. 1995. Vol. 374. P. 351—355.

Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Metenler G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretaillade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C. P. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite Encephalitozoon cuniculi // Nature. 2001. Vol. 414, N 22. P. 450—453.

Lewis L. C., Mutchmor J. A, Lynch R. E. Effect of Perezia pyraustae on oxygen consumption by the European corn borer, Ostrinia nubilalis // J. Insect. Physiol. 1971. Vol. 17. P. 2457—2468.

Undeen A. H., El Gazzar L. M., Van der Meer R. K., Narang S. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of Nosema algerae (Microspora: Nosematidae) // J. Invertebr. Pathol. 1987. Vol. 50. P. 230—237.

Van de Peer Y., Ben Ali A., Meyer A. Microsporidia accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and susceptibly primitive eukaryotes are just curious fungi // Gene. 2000. Vol. 246. P. 1—8.

Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. Trehalase activity associated with spores of Nosema apis // J. Invertebr. Pathol. 1971. Vol. 17. P. 38—41.

Vossbrinck C., Maddox J., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B., Woese C. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes // Nature. 1987. Vol. 326. P. 411—414.

Weidner E., Findley A. M., Dolgikh V., Sokolova J. Microsporidian biochemistry and physiology // The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology. Washington: D. C., 1999. P. 172—195.

Weiss L. M. Microsporidia: emerging pathogenic protists // Acta Trop. 2001. Vol. 78. P. 89—102.

Zomorodipour A., Andersson S. G. E. Obligate intracellular parasites: Rickettsia prowazekii and Chlamydia trachomatis // FEBS Letters. 1999. Vol. 452. P. 11—15.

ВИЗР РАСХН, СПб.—Пушкин-8, 196608

Поступила 20.06.2002

PECULIARITIES OF METABOLISM OF THE MICROSPORIDIA NOSEMA GRYLLI DURING THE INTRACELLULAR DEVELOPMENT

V. V. Dolgikh, P. B. Semenov, M. V. Grigor'yev

Key words: microsporidia, energy metabolism, host-parasite interactions.

SUMMARY

A long adaptation of Microsporidia to intracellular development supposes the host-derived ATP dependence of merogony and sporogony stages. To prove this assumption the activities of ten carbohydrate and energy metabolism enzymes were compared in the microsporidia *Nosema grylli* intracellular stages and mature spores. This species infects the fat body of crickets *Gryllus bimaculatus*. We have demonstrated lower activities of glycolytic enzymes, phosphoglucomutase and glucose-6-PhDH in the metabolically active meronts and sporonts than in the dormant mature spores. Low glycolysis level indicates that carbohydrate catabolism is not a principal mechanism of ATP supply in the *N. grylli* intracellular stages. Furthermore, we have not revealed a preferable expenditure of glycogen in comparison with triglycerides in infected cricket fat bodies. The *N. grylli* infection causes an equal reduction of glycogen and lipid content approximately in 2—3 times. Microsporidia have not mitochondria, Krebs cycle and electron-transport chain. Therefore they are not able to utilise fat reserves for ATP production. It seems to be proposed that microsporidia consume exogenous ATP which is produced by host cell metabolic system. The *N. grylli* infection provokes an increase of ATP content and ratio of ATP/ADP concentrations in cricket fat bodies approximately in 4 times. These data indicates a rise of host cell energy metabolism rate during the infection.